

## HPLC 同时测定杞菊地黄口服液 12 种成分

郑艳萍<sup>1</sup>, 王欣玲<sup>2</sup>, 李伟东<sup>2</sup>, 金俊杰<sup>1</sup>, 杨冰<sup>1</sup>, 蔡宝昌<sup>1,2\*</sup>

1. 南京海昌中药集团有限公司, 江苏 南京 210061

2. 江苏海昇药业有限公司, 江苏 南京 210061

**摘要:** **目的** 建立一种快速、准确和实用的 HPLC 方法, 用于同时测定杞菊地黄口服液中 5-羟甲基糠醛 (5-HMF)、莫诺苷、绿原酸、隐绿原酸、马钱苷、芍药苷、毛蕊花糖苷、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、丹皮酚的含量。**方法** 采用 YMC ODS 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 35 °C, 以 0.1% 甲酸水溶液-乙腈为流动相进行梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 254、325 nm, 进样量 10 μL。**结果** 5-HMF、莫诺苷、绿原酸、隐绿原酸、马钱苷、芍药苷、毛蕊花糖苷、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、丹皮酚进样量在 0.08~1.60、0.12~2.40、0.09~1.80、0.06~1.20、0.10~2.00、0.30~6.00、0.01~0.20、0.01~0.20、0.01~0.20、0.005~0.10、0.005~0.10、0.01~0.20 μg 与峰面积呈良好的线性关系, 精密度、重复性、稳定性均良好, RSD 均小于 3.5%, 加样回收率均在 96%~103%, RSD 分别为 2.13%、3.45%、2.86%、2.59%、3.15%、3.49%、2.19%、3.25%、2.37%、2.53%、2.91%、3.35%, 测定 5 批样品中各成分含量稳定, 所测 12 种成分质量浓度分别为 98.56~102.56、204.28~212.10、18.53~18.89、1.95~2.05、12.31~12.54、87.01~87.12、5.35~5.43、16.08~16.15、8.69~8.72、8.89~8.95、5.12~5.19、1.87~1.94 μg/mL。**结论** 本方法可以同时测定杞菊地黄口服液中 5-HMF、莫诺苷、绿原酸、隐绿原酸、马钱苷、芍药苷、毛蕊花糖苷、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、丹皮酚的含量, 适用于杞菊地黄口服液的质量控制。

**关键词:** 杞菊地黄口服液; 质量控制; HPLC; 5-HMF; 莫诺苷; 绿原酸; 隐绿原酸; 马钱苷; 芍药苷; 毛蕊花糖苷; 木犀草苷; 异绿原酸 B; 异绿原酸 A; 异绿原酸 C; 丹皮酚

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)04-0875-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.04.013

## Simultaneous determination of 12 components in Qiju Dihuang Oral Liquid by HPLC

ZHENG Yan-ping<sup>1</sup>, WANG Xin-ling<sup>2</sup>, LI Wei-dong<sup>2</sup>, JIN Jun-jie<sup>1</sup>, YANG Bing<sup>1</sup>, CAI Bao-chang<sup>1,2</sup>

1. Nanjing Haichang Chinese Medicine Group Co., Ltd., Nanjing 210061, China

2. Jiangsu Haisheng Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing 210061, China

**Abstract: Objective** To establish a rapid, accurate, and practical HPLC method for simultaneous determination the content in Qiju Dihuang Oral Liquid (QDOL) of 5-HMF, morroniside, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, loganin, paeoniflorin, verbascoside, luteoloside, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid C, and paeonol. **Methods** YMC ODS column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used, column temperature was set at 35 °C, gradient elution with 0.1% formic acid aqueous solution-acetonitrile was used as mobile phase, flow rate was 1.0 mL/min, detection wavelength was 254 and 325 nm. The injection volume was 10 μL. **Results** The injection amount of 5-HMF, morroniside, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, loganin, paeoniflorin, verbascoside, luteoloside, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid C, paeonol injection quality at 0.08—1.60, 0.12—2.40, 0.09—1.80, 0.06—1.20, 0.10—2.00, 0.30—6.00, 0.01—0.20, 0.01—0.20, 0.01—0.20, 0.005—0.10, 0.005—0.10, and 0.01—0.20 μg showed a good linear relationship with peak area, with good precision, repeatability and stability. The recovery rates of the samples were between 96% and 103%, the RSD was 2.13%, 3.45%, 2.86%, 2.59%, 3.15%, 3.49%, 2.19%, 3.25%, 2.37%, 2.53%, 2.91%, and 3.35%, respectively. The content of each component of the five batches of samples was stable, and the mass concentrations

收稿日期: 2018-11-07

基金项目: 江苏省重点研发计划——社会发展项目 (BE2016626)

作者简介: 郑艳萍 (1981—), 女, 助理研究员, 主要从事中药分析与质量标准研究。Tel: 15951797765 E-mail: zyp611@163.com

\*通信作者 蔡宝昌, 教授, 主要从事中药炮制研究。Tel: (025)68193567 E-mail: 371463732@qq.com

range of the 12 components tested were 98.56—102.56, 204.28—212.10, 18.53—18.89, 1.95—2.05, 12.31—12.54, 87.01—87.12, 5.35—5.43, 16.08—16.15, 8.69—8.72, 8.89—8.95, 5.12—5.19, and 1.87—1.94  $\mu\text{g/mL}$ . **Conclusion** The method simultaneously determines the content of 5-HMF, morroniside, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, loganin, paeoniflorin, verbascoside, luteoloside, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid C, and paeonol in QDOL, which is suitable for the quality control of QDOL.

**Key words:** Qiju Dihuang Oral Liquid; quality control; HPLC; 5-HMF; morroniside; chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; loganin; paeoniflorin; verbascoside; luteoloside; isochlorogenic acid B; isochlorogenic acid A; isochlorogenic acid C; paeonol

杞菊地黄口服液 (Qiju Dihuang Oral Liquid, QDOL) 是在六味地黄丸<sup>[1]</sup>基础上增加了枸杞子、菊花 2 味药材, 枸杞子补肾益精、养肝明目; 菊花善清利头目、宣散肝经之热, 增强明目、清肝火作用<sup>[2-3]</sup>。两者同属于滋阴补肾药物。8 种药物配伍组合共同发挥滋阴、养肝、明目的作用滋肾养肝, 用于肝肾阴亏、眩晕耳鸣、羞明畏光、迎风流泪、视物昏花。QDOL<sup>[4]</sup>收录于《中药部颁成方制剂》(WS3-B-2146-96), 产品检验规定了性状、鉴别、检查、含量测定等检测项目, 只对芍药苷成分进行了含量测定, 未对产品其他组成药材进行定性和定量检测, 不能全面把控该类产品的质量, 严重影响 QDOL 治疗效果。《中国药典》2015 年版<sup>[1]</sup>以莫诺昔、马钱苷和丹皮酚的含量作为杞菊地黄丸 (浓缩丸) 检测指标, 该方法对 QDOL 的质量控制具有较好的参考价值, 但是指标也只局限于山茱萸和牡丹皮这 2 味药材的控制上, 还不能更全面反映 QDOL 整体质量。本研究通过同时测定提取浓缩过程中产生的 5-HMF; 酒萸肉中莫诺昔和马钱苷; 菊花中绿原酸、隐绿原酸、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A 和异绿原酸 C; 牡丹皮中芍药苷和丹皮酚; 地黄中毛蕊花糖苷共 12 种成分的含量来控制 QDOL 的质量, 更客观、全面地体现 QDOL 中中药的配伍共同发挥药效。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

BP121S 分析天平, 梅特勒-托利多公司, 精度 0.1 mg; 岛津 LC-20AB (DAD 检测器) 高效液相色谱仪, 日本岛津公司; BP211D 型电子分析天平, 德国赛多利斯 (Sartorius) 公司, 精度 0.001 mg; KQ3200DB 型数控超声清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; TGL-16C 离心机, 上海安亭科学仪器厂。

### 1.2 药品与试剂

QDOL 样品均来自江苏海昇药业有限公司, 批号分别为 140401、160301、160503、170505、170806; 对照品隐绿原酸 (批号 150728, 质量分数  $\geq 98\%$ )、毛蕊花糖苷 (批号 61276-17-3, 质量分数  $\geq 98\%$ )、

异绿原酸 B (批号 150726, 质量分数  $\geq 98\%$ )、异绿原酸 A (批号 151028, 质量分数  $\geq 98\%$ )、异绿原酸 C (批号 150624, 质量分数  $\geq 98\%$ ) 均购自南京森贝伽生物科技有限公司; 对照品 5-HMF (批号 111626-201509, 质量分数  $\geq 98\%$ )、莫诺昔 (批号 111998-201501, 质量分数 96.8%)、绿原酸 (批号 110753-201415, 质量分数 96.2%)、木犀草苷 (批号 111720-200905, 质量分数 96.5%)、马钱苷 (批号 111640-201005, 质量分数 99.2%)、芍药苷 (批号 110736-201539, 质量分数  $\geq 98\%$ )、丹皮酚 (批号 110708-200506, 质量分数  $\geq 98\%$ ) 均购于中国食品药品检定研究院; 甲醇、石油醚、乙醚、磷酸, 分析纯, 乙腈, 色谱纯, 实验所用到的试剂均购于南京化学试剂有限公司; 娃哈哈纯净水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件<sup>[5-9]</sup>

色谱柱为 YMC-Pack ODS-A 柱 (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱程序: 0~10 min, 5% 乙腈; 10~20 min, 5%~10% 乙腈; 20~90 min, 10%~30% 乙腈; 90~105 min, 30%~55% 乙腈; 二极管阵列检测器 (DAD) 200~800 nm 全波长扫描, 检测波长 254、325 nm; 柱温 35  $^{\circ}\text{C}$ ; 体积流量 1 mL/min; 进样体积 10  $\mu\text{L}$ ; 理论塔板数以各成分峰计算均不低于 3 000。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 供试品溶液制备** 精密量取 QDOL 10 mL, 置蒸发皿中, 水浴挥干, 加入 5 mL 甲醇超声处理 (功率 150 W, 频率 20 kHz) 30 min, 放冷, 滤过得滤液, 定容至 10 mL, 过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 即得。

**2.2.2 酚酸类混合对照品溶液制备** 取绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、丹皮酚适量, 精密称定, 加甲醇制成含绿原酸 90  $\mu\text{g/mL}$ 、隐绿原酸 60  $\mu\text{g/mL}$ 、异绿原酸 B 10  $\mu\text{g/mL}$ 、异绿原酸 A 50  $\mu\text{g/mL}$ 、异绿原酸 C 50  $\mu\text{g/mL}$ 、丹皮酚 50  $\mu\text{g/mL}$  的混合对照品溶液, 摇匀, 即可。

**2.2.3 其他类混合对照品溶液制备** 取 5-HMF、莫

诺昔、马钱苷、芍药苷、毛蕊花糖苷、木犀草苷适量，精密称定，加甲醇制成含 5-HMF 80 μg/mL、莫诺昔 120 μg/mL、马钱苷 10 μg/mL、芍药苷 300 μg/mL、毛蕊花糖苷 10 μg/mL、木犀草苷 30 μg/mL 的混合对照品溶液，摇匀，即可。

### 2.3 系统适用性试验

分别吸取对照品溶液、供试品溶液，注入高效液相色谱仪进行测定，HPLC 图见图 1。

### 2.4 线性关系考察

取“2.2”项下酚酸类混合对照品溶液和其他类

混合标准品溶液分别以 1、2、5、10、15、20 μL 进样，测定峰面积，以对照品进样量为横坐标 (X)，峰面积积分值为纵坐标 (Y)，绘制标准曲线，计算回归方程。结果见表 1。

### 2.5 精密度试验

取经“2.2.1”项方法制备的样品批号为 140401 供试品溶液，按照“2.1”项下的液相条件进行分析，平行进样 6 次，进样量为 10 μL，以 5-HMF、莫诺昔、绿原酸、隐绿原酸、马钱苷、芍药苷、毛蕊花糖苷、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿

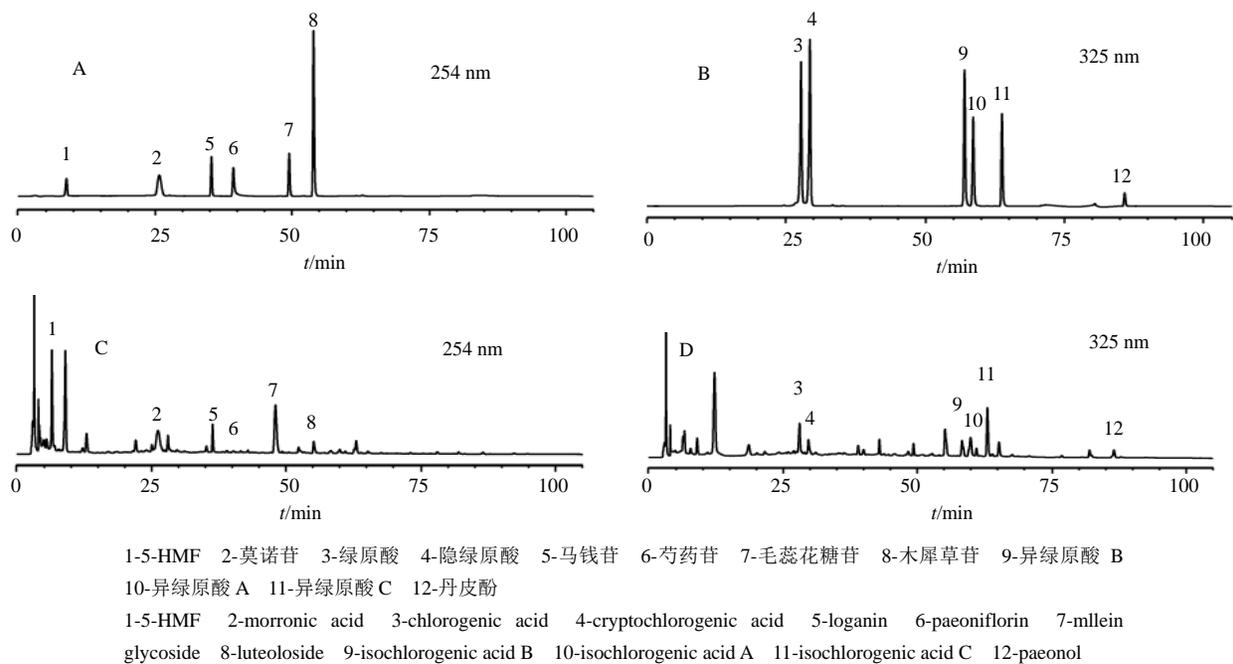


图 1 其他类混合对照品 (A)、酚酸类混合对照品 (B) 及供试品 (C, D) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of other types of mixed reference (A), phenolic acid mixed reference (B), and tested samples (C, D)

表 1 标准曲线

Table 1 Standard curve line

成分	线性方程	线性范围/μg	r <sup>2</sup>	检测波长/nm
5-HMF	$Y=43\ 349X+904.57$	0.08~1.60	0.999 8	254
莫诺昔	$Y=8\ 949.5X+9\ 168.1$	0.12~2.40	0.997 7	254
绿原酸	$Y=33\ 285X-72\ 252$	0.09~1.80	0.993 1	325
隐绿原酸	$Y=50\ 718X+161\ 232$	0.06~1.20	0.992 2	325
马钱苷	$Y=5\ 725.7X-902.94$	0.10~2.00	1.000 0	254
芍药苷	$Y=1\ 119.5X-9\ 920.9$	0.30~6.00	0.999 9	254
毛蕊花糖苷	$Y=34\ 815X-475.21$	0.01~0.20	1.000 0	254
木犀草苷	$Y=26\ 180X-3\ 938.5$	0.01~0.20	1.000 0	254
异绿原酸 B	$Y=26\ 046X+14\ 210$	0.01~0.20	0.999 9	325
异绿原酸 A	$Y=34\ 919X+30\ 387$	0.005~0.10	0.998 7	325
异绿原酸 C	$Y=34\ 394X+8\ 482.8$	0.005~0.10	0.997 2	325
丹皮酚	$Y=4\ 989.6X-4\ 055.8$	0.01~0.20	1.000 0	325

原酸 C、丹皮酚峰面积的 RSD 值分别为 1.32%、2.58%、3.45%、2.01%、1.94%、1.53%、1.49%、2.05%、2.53%、2.41%、0.98%、2.58%，结果表明该设备的平行进样精密度良好。

### 2.6 稳定性试验

取经“2.2.1”项方法制备的样品批号为 140401 供试品溶液，按照“2.1”项下的液相色谱条件进行分析，采用 0、2、6、12、18、24 h 不同时间点进样分析，进样量为 10 μL，以 5-HMF、莫诺苷、绿原酸、隐绿原酸、马钱苷、芍药苷、毛蕊花糖苷、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、丹皮酚的峰面积 RSD 值分别为 2.47%、1.25%、2.53%、3.47%、3.15%、2.34%、1.13%、1.14%、1.83%、2.64%、2.89%、2.79%，结果表明供试品溶液在 24 h 之内的色谱峰面积变化不大，稳定性非常好。

### 2.7 重复性试验

平行精密称取批号为 140401 样品 6 份，按照“2.2.1”项的方法制成 6 份同样的供试品溶液，参照“2.1”项的色谱条件，进样量为 10 μL，以 5-HMF、莫诺苷、绿原酸、隐绿原酸、马钱苷、芍药苷、毛蕊花糖苷、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、丹皮酚质量浓度的 RSD 值分别为 2.47%、1.25%、2.53%、3.47%、3.15%、2.34%、1.13%、1.14%、1.83%、2.64%、2.89%、2.79%，结果表明

样品色谱峰重现性好，该方法的重复性良好。

### 2.8 加样回收率试验

取 QDOL (140401) 6 份，每份 5 mL，精密量取，精密加入对照品 5-HMF、莫诺苷、绿原酸、隐绿原酸、马钱苷、芍药苷、毛蕊花糖苷、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、丹皮酚的量约为 QDOL 所含各对照品相当的量，用纯水定容至 10 mL，按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件分析，结果 5-HMF、莫诺苷、绿原酸、隐绿原酸、马钱苷、芍药苷、毛蕊花糖苷、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、丹皮酚的平均回收率分别为 97.52%、98.35%、96.35%、101.56%、102.25%、98.26%、96.37%、97.56%、98.36%、97.58%、98.83%、97.86%，RSD 分别为 2.13%、3.45%、2.86%、2.59%、3.15%、3.49%、2.19%、3.25%、2.37%、2.53%、2.91%、3.35%，结果表明，所建立的方法加样回收率良好。

### 2.9 供试品含量测定

取 5 个批次(140401、160301、160503、170505、170806)的 QDOL 样品，按照“2.2.1”项法制备供试品溶液，按“2.1”项方法检测，结果见表 2。

## 3 讨论

### 3.1 样品溶液制备条件优化

通过对样品蒸干、稀释、萃取等处理后使用不

表 2 样品含量测定结果 (n = 3)

Table 2 Sample content determination results (n = 3)

批号	质量浓度/(μg·mL <sup>-1</sup> )											
	5-HMF	莫诺苷	绿原酸	隐绿原酸	马钱苷	芍药苷	毛蕊花糖苷	木犀草苷	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C	丹皮酚
140401	99.79	204.28	18.68	1.98	12.50	87.01	5.39	16.10	8.73	8.94	5.16	1.91
160301	98.56	212.10	18.56	1.95	12.46	87.05	5.41	16.15	8.76	8.92	5.12	1.89
160503	101.37	205.83	18.89	2.05	12.54	87.08	5.35	16.13	8.71	8.97	5.19	1.93
170505	99.08	208.15	18.53	1.99	12.31	87.01	5.43	16.11	8.72	8.89	5.13	1.87
170806	102.56	207.86	18.75	2.02	12.42	87.12	5.39	16.08	8.69	8.95	5.17	1.94

同提取溶剂(甲醇、水、70%乙醇水溶液、85%乙醇水溶液、95%乙醇、无水乙醇)复溶，进行实验比较，结果发现蒸干后复溶所得的谱图差异响应值较高，基线平稳，故采用蒸干后复溶的方法；对复溶溶剂的考察中发现甲醇提取物色谱图信息量最多，成分含量最高；所以选用水浴挥干，加甲醇超声复溶处理。

### 3.2 色谱条件的优化

采用二极管阵列检测器对检测波长进行考察，

提取 254、280、284、300、325 nm 处的色谱图，结果发现检测波长为 254 nm 时，皂苷类成分色谱图所包含的信息量最全面且基线平稳，故选 254 nm 为皂苷类<sup>[10-12]</sup>成分检测波长；发现检测波长为 325 nm 时，酚酸类<sup>[13-15]</sup>成分色谱图所包含的信息量最全面且基线平稳，故选 325 nm 为酚酸类成分检测波长。

比较了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸、乙腈和 0.05%磷酸水、乙腈-0.1%磷酸水 5 个不同洗脱

系统在不同梯度下的洗脱效果。结果发现以乙腈和 0.1% 甲酸水, 为流动相时, QDOL 中各成分能达到很好的分离效果, 故最终选定以乙腈和 0.1% 甲酸水, 为流动相。

### 3.3 指标成分的选取

QDOL<sup>[4]</sup>是取菊花、牡丹皮的蒸馏液与其药渣水煎液和枸杞子、熟地黄、山茱萸、山药、泽泻水煎液合并后浓缩、醇沉、回收乙醇后, 与茯苓提取液合并, 加单糖浆、防腐剂、水, 搅匀, 滤过, 灌封, 即得。QDOL 制作工艺比杞菊地黄丸(直接打粉制作)复杂, 最大限度的浓缩了这 8 味药的药效成分, 使其相互协同发挥着滋肾养肝作用, 是一个完整的组成体系, 缺少哪一味药都不能达到应有疗效, 因此, 笔者尽可能多的选取检测指标来控制 QDOL 的质量, 更加全面完整地反映产品的确切疗效。本研究建立了 HPLC 测定 QDOL 主要成分的方法, 且该方法稳定可靠, 为 QDOL 质量标准制定奠定实验基础。

#### 参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.  
 [2] 陶娜, 李亚兰, 项奕. 杞菊地黄丸对白内障术后干眼症患者疗效, B $\mu$ T, SIT 及 FL 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(23): 166-170.  
 [3] 黎绮雯. 杞菊地黄丸联合重组成纤维细胞生长因子凝胶治疗白内障术后干眼症的临床研究 [J]. 中医药导报, 2016, 22(6): 93-95.  
 [4] 中华人民共和国卫生部药品标准. 中药成方制剂 (第十一册) [S]. 1996.  
 [5] 李桂本, 王海波, 李振国. HPLC 波长切换技术同时测定知柏地黄丸 (浓缩丸) 中莫诺昔、芒果昔、马钱昔和

丹皮酚的含量 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(1): 125-128.  
 [6] 潘莹, 郭小龙, 陈勇, 等. HPLC 法测定杞菊地黄丸中马钱昔、芍药昔和丹皮酚的含量 [J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(2): 133-135.  
 [7] 李润泽, 常增荣, 傅欣彤, 等. HPLC 法测定杞菊地黄丸中莫诺昔、马钱昔和丹皮酚的含量 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(2): 351-354.  
 [8] 李娟, 王本杰, 袁桂艳, 等. 六味地黄丸中四种活性成分的 HPLC 法测定 [J]. 中国医药工业杂志, 2010, 41(2): 126-128.  
 [9] 王晓燕, 霍甜甜, 李振国, 等. 一测多评法同时测定杞菊地黄口服液中 4 种有效成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37(2): 290-296.  
 [10] 张雪, 彭富全, 何风雷. 一测多评法测定昆仙胶囊中 10 种黄酮类成分 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5823-5829.  
 [11] 冯兵, 陈婷, 赵瑞芝, 等. HPLC 测定复方昆丹胶囊中芍药内酯昔、芍药昔、二苯乙烯昔、五没食子酰葡萄糖 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 112-116.  
 [12] 韩根利, 刘宏胜, 王树森, 等. RP-HPLC 法同时测定山茱萸类制剂中莫诺昔、马钱昔、山茱萸新昔、齐墩果酸及熊果酸 [J]. 中草药, 2017, 48(24): 5168-5173.  
 [13] 郑艳萍, 朱红军, 秦昆明, 等. 川建曲中 5 种成分含量的测定及 HPLC 指纹图谱的初步建立 [J]. 中药材, 2018, 41(5): 1139-1142.  
 [14] 任莹, 范姣姣, 张鑫. HPLC 法测定复方双花片中绿原酸、咖啡酸、连翘昔、穿心莲内酯和木犀草素 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(7): 1192-1195.  
 [15] 李静, 张青, 肖春霞, 等. HPLC 波长切换法同时测定排毒养颜胶囊中 10 种成分 [J]. 中草药, 2018, 49(20): 4824-4830.